

УДК 616.153.1:577.152.34+616.154:577.175.85]-074

© Коллектив авторов

ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА, СВОЙСТВА ФАКТОРА XII И ЕГО АКТИВНОГО ФРАГМЕНТА (β -XIIa).

Т.Б. Блохина, Е.А. Нешкова, Г.А. Яровая

Российская медицинская академия последипломного образования, кафедра биохимии,
123995, Москва, Баррикадная ул., д. 2; тел./ факс: 945-24-15;
эл. почта: acadbio@orc.ru

Предложен способ выделения фактора свертывания крови XII и его активного фрагмента β -XIIa из одной порции крови. Выделение включает традиционные хроматографические методы и высокоэффективную хроматографию при умеренном давлении. Полученные препараты гомогенны при диск-электрофорезе и имеют удельную активность равную 70,6 Ед и 2,5 Ед соответственно. Метод позволяет выделять эти факторы в препаративных количествах и процедура получения занимает меньше времени, чем в известных методиках.

Ключевые слова: контактная система активации, XII фактор свертывания крови (фактор Хагемана), фрагмент β -XIIa, получение, очистка, свойства.

ВЕДЕНИЕ. Роль фактора Хагемана (фактора XII свертывания крови) до сих пор остается не ясна, несмотря на многочисленные исследования, посвященные компонентам протеолитических систем плазмы крови и в том числе фактору XII. В настоящее время известно, что фактор XII синтезируется в печени в виде одной полипептидной цепи с молекулярной массой 78 кДа. Он является гликопротеином, содержащем 7% углеводов [1-3]. Его мРНК содержит ~2100 нуклеотидов и кодирует последовательность из 596 аминокислот, составляющих зрелый белок.

Фактор XII состоит из нескольких доменов: домена II типа фибронектина, домена ростового фактора, домена I типа фибронектина, второго ростового домена, крингл-домена и каталитического домена, типичного для сериновых протеиназ [2,4-8]. Активацию фактора XII осуществляет калликреин (К), действие которого увеличивается в присутствии высокомолекулярного кининогена (ВМК) [9]. При этом последовательно образуются две активные формы фактора - α -XIIa и β -XIIa. Расщепление связи (Arg353 - Val354) в молекуле предшественника приводит к образованию α -XIIa - формы фермента, состоящей из тяжелой (353 аминокислотных остатка) и легкой (243 остатка) цепей, соединенных дисульфидной связью [10]. Активный центр фактора α -XIIa формирует классическую триаду из остатков His40, Asp89 и Ser191. Форма β -XIIa образуется после гидролиза еще двух пептидных связей, что и приводит к генерированию 30 кДа-формы, представляющей собой легкую цепь фермента с небольшим фрагментом тяжелой цепи [11, 12]. Форма β -XIIa является более эффективным активатором прекалликреина (ПК), а α -XIIa - фактора XI [12].

До недавнего времени фактор XII традиционно рассматривался как начальный компонент внутреннего пути активации гемокоагулирующего каскада и

ОЧИСТКА ФАКТОРА XII И ЕГО АКТИВНОГО ФРАГМЕНТА (β -XIIa).

основной активатор прекалликреина. Взаимоактивация фактора XII и ПК осуществляется так называемой контактной системой и протекает на полианионной поверхности. В контактной системе участвуют четыре белка: факторы XII и XI гемокоагуляции, ПК и ВМК. Есть основания полагать, что фактор XII (зимоген) при адсорбции на анионной поверхности в присутствии ВМК подвергается активации, сопровождающейся ступенчатыми конформационными изменениями, приводящими к экспонированию активного центра в зимогене и формированию активной формы фактора XIIa. Калликреин, являясь наиболее эффективным активатором фактора XII, осуществляет протеолитическую активацию последнего в результате чего продуцируются две активные формы фактора XIIa: α -XIIa и β -XIIa, которые в свою очередь являются активаторами фактора XI и ПК.

В последние годы существенно изменились представления о функциях фактора XII и всей контактной системы активации. Стало ясно, что контактная система плазмы крови играет существенную роль в фибринолизе (приводит к активации плазминогена и проурокиназы под действием К [13, 14]). Кроме того, К активирует проренин и компоненты комплемента (C1 и B). В соответствии с гипотезой контактной активации фактора XII и ПК на полианионной поверхности наиболее вероятным пусковым механизмом является автоактивация фактора XII.

Установлено, что формирование ансамбля белков контактной активации на полибелковом рецепторе происходит на эндотелиальных клетках и приводит к активации ПК на поверхности эндотелиоцитов под действием мембранной цинк-зависимой протеиназы без участия фактора XII [15-17]. Фактор XII активируется вторично образовавшимся К и далее процесс амплифицируется за счет реципрокной активации ПК и фактора XII. Фактор XI, также связанный в ансамбль белков на эндотелиальных клетках, может активироваться по тому же механизму, каким активируется ПК без участия фактора XII [15-19].

Таким образом, ранее предполагаемая роль фактора XII как активатора прекалликреина и фактора XI в настоящее время поставлена под сомнение и его функции ещё предстоит выяснить. Однако изучение функциональных свойств фактора XII существенно затруднено отсутствием коммерческих очищенных препаратов этого белка, в связи с этим получение и изучение свойств фактора XII, его активных форм важно для выяснения функций этого фермента и контактной системы активации в целом, для расшифровки молекулярных механизмов взаимодействия и координации активности протеолитических систем плазмы крови и нарушения этих процессов при патологии.

Анализ приведенных в литературных источниках способов выделения фактора XII и его активных форм показывает, что существующие методы получения высокоочищенных препаратов трудоемки, включают множество стадий очистки, трудно воспроизводимы. Именно поэтому, несмотря на большой и многоплановый интерес к этим белкам, до сих пор не появилось коммерческих препаратов фактора XII, фактора α -XIIa и фрагмента β -XIIa.

МЕТОДИКА. *Выделение прекалликреина, фактора XII и его активного фрагмента β -XIIa.*

В работе использованы следующие буферные растворы: буфер А) 0,1 М трис-HCl буфер (pH 8,0) с 3 мМ ЭДТА, 0,02% NaN₃, 0,005% полибренон; буфер В) 0,025 М Na-фосфатный буфер (pH 5,5), содержащий 0,1 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,02% NaN₃; буфер С) 0,025 М Na-фосфатный буфер (pH 5,5); буфер D) 0,01 М трис-HCl буфер (pH 8,0) с 0,3 М NaCl и 3 мМ ЭДТА, 0,02% NaN₃, 0,005% полибренон; буфер Е) 20 мМ трис- HCl буфер (pH 8,0) с 3 мМ ЭДТА, 0,02% NaN₃, 0,005% полибренон; буфер F) 0,05 М трис- HCl буфер (pH 7,0) с 3 мМ ЭДТА, 0,02% NaN₃.

Кровь доноров, взятую из локтевой вены силиконизированной иглой в пластиковую посуду, центрифугировали 20 мин. при температуре 4° С, 2500 г. Из 300 мл крови после центрифугирования получали 120-160 мл сыворотки, которую разводили в два раза буфером А. Разведенную сыворотку наносили на колонку

(С 26/100) ("Pharmacia LKB", Швеция) с QAE-сефадексом А-50, уравновешенным буфером А, со скоростью 20 мл в час. Разделение белков сыворотки крови проводили при комнатной температуре, охлаждая фракции по мере выхода из колонки.

Получение прекалликреина.

ПК в этих условиях выходит в неадсорбированной на анионите фракции белков в объеме 140-150 мл с удельной активностью от 0,02 до 0,05 Ед. Фракции, содержащие ПК, объединяли, диализовали против буфера В в течение 48 часов при 4°C.

Для дальнейшей очистки ПК диализат наносили на колонку (С 16/40) ("Pharmacia LKB"), содержащую СМ - сефадекс, уравновешенный буфером В при температуре 4°C. По окончании нанесения материала колонку с сорбентом промывали исходным буфером. Элюцию ПК проводили линейным градиентом NaCl от 0 до 0,4 М с объемом градиентной жидкости 400 мл. Фракции объемом 3-4 мл, содержащие ПК, объединяли. Полученный ПК не имел исходной эстеразной активности, исследуемой с бензоил-аргинин-этиловым эфиром (БАЭЭ) в качестве субстрата, стабильно хранился при температуре 4°C в течение нескольких месяцев, при активации трипсином проявлял удельную БАЭЭ-эстеразную активность равную 2,38 Ед на мг белка.

По мере необходимости очищенный препарат ПК диализовали против буфера С и аликвотами по 200-500 мкл наносили на колонку с Superose 6 HR (10/30) ("Pharmacia LKB"), уравновешенную тем же буфером, и проводили гель-фильтрацию на FPLC® System ("LKB", Швеция) со скоростью 0,3 мл/мин. После гель-фильтрации нами был получен высокоочищенный препарат ПК с удельной эстеразной активностью 3,5 - 5,0 Ед на мг белка.

Получение фактора XII.

После выделения неадсорбированной фракции сыворотки крови колонку промывали буфером А с 0,05 М NaCl при температуре 4°C. Фактор XII элюировали линейным градиентом NaCl от 0,05 М до 0,4 М, во фракциях измеряли поглощение при $\lambda = 280$ нм и содержание фактора XII по его прекалликреин-активирующему действию после активации фактора трипсином. На рис. 1 приведены выходные кривые, соответствующие оптическому поглощению белковых фракций при 280 нм и содержанию фактора XII.

Фракции, содержащие фактор XII, объединяли и диализовали против буфера А с 0,05 М NaCl.

Для рехроматографии и концентрирования диализат наносили на колонку (С 16/40) с QAE -сефадексом А-50, уравновешенным буфером А с 0,05 М NaCl со скоростью 6-9 мл в час при + 4°C. По окончании нанесения материала колонку промывали исходным буфером до $A_{280} = 0,02$. Элюцию фактора XII осуществляли линейным градиентом NaCl от 0,05 до 0,65 М, во фракциях измеряли поглощение при $\lambda = 280$ нм и содержание фактора XII определяли, как было описано выше. Фракции, содержащие фактор XII, объединяли.

Гель-фильтрацию элюата, содержащего фактор XII, проводили на колонке (К 50/100) с сефадексом G-200, предварительно уравновешенным буфером D, со скоростью 15 мл в час при температуре 4°C. Фракции, содержащие фактор XII, объединяли и диализовали при температуре 4°C против буфера А.

Диализат наносили на колонку (С 16/20) с QAE -сефадексом А-50, уравновешенным буфером А со скоростью 8 мл в час при 4°C. По окончании нанесения материала колонку промывали исходным буфером А с 0,025 М NaCl до $A_{280} = 0,02$. Элюцию фактора XII проводили линейным градиентом NaCl от 0,025 М до 0,6 М. После этой стадии выделения фактора XII часть материала использовали для получения фрагмента фактора β -XIIa, а остальную часть разливали небольшими порциями и хранили при температуре - 70°C. Указанный способ хранения профермента не приводил к изменению содержания фактора XII в течение 1-1,5 лет.

ОЧИСТКА ФАКТОРА XII И ЕГО АКТИВНОГО ФРАГМЕНТА (β -XIIa).

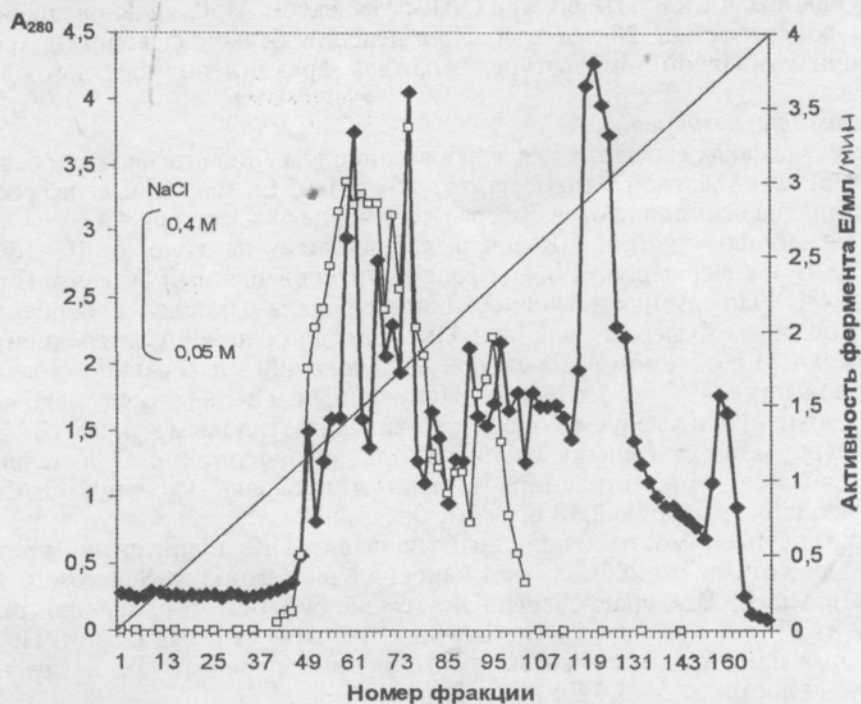


Рисунок 1

Ионообменная хроматография сыворотки крови донора на QAE-сефадексе A-50.
 \blacklozenge - Содержание белка A_{280} ; \square - Активность фактора XIIa; ——— прямой линией указан градиент NaCl. Условия описаны в тексте.

В дальнейшем очищенный препарат фактора XII диализовали против буфера Е. Аликвоты фактора XII по 200-500 мкл наносили на колонку с Superose 6 HR 10/30, уравновешенной тем же буфером и проводили гель-фильтрацию на FPLC® System со скоростью 0,3 мл/мин при комнатной температуре. Как видно (рис.2) из хода кривых, соответствующих оптическому поглощению при $\lambda = 280$ нм белковых фракций фактор XII выходит между двумя белковыми пиками с активностью 4,6 Ед./мл/мин.

Результаты одного из типичных опытов выделения и очистки фактора XII представлены в таблице.

Данные, представленные в таблице, показывают, что в ходе выделения фактора XII из сыворотки крови человека достигается очистка его в 1188 раз по удельной активности, содержание фактора XII по его прекалликреин-активирующему действию после активации фактора трипсином составляет 70,6 Ед./мг, а выход после хроматографии на FPLC по сравнению с 4 стадией очистки составил 44%.

Получение фактора β -XIIa.

Для получения активного фрагмента β -XIIa часть фактора XII подвергали энзиматическому фрагментированию. С этой целью к элюату после четвертой стадии выделения добавляли трипсин в молярном отношении 1:50 и инкубировали при температуре 25°C в течение часа при постоянном перемешивании, после чего активность трипсина подавлялась овомукоином. Полученный гидролизат диализовали против буфера F и наносили на колонку (С 10/20) с ДЕАЕ - сефадексом, уравновешенным буфером, против которого проводили диализ. Диализ и хроматографию фермента проводили при температуре 4 °С. По окончании внесения диализата колонку промывали исходным буфером до $A_{280} = 0,02$ и фрагмент фактора XII - β -XIIa элюировали линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 0,7 М. Фракции, содержащие

Таблица. Основные этапы очистки фактора XII из сыворотки крови человека.

Этапы очистки	Общий объем, мл	Активность* мкмоль/мин на мл	Общая активность мкмоль/мин	Белок A ₂₈₀ мг/мл	Удельная активность мкмоль/мин на мг белка	Степень очистки
1. Хроматография на QAE-сефадексе А-50	550	2,346	1300,2	39,785	0,0594	1
2. Хроматография на QAE-сефадексе А-50.	180	3,375	607,5	4,182	0,807	13,58
3. Гель-фильтрация на G-200	155	5,485	850,2	0,684	6,554	110,34
4. Хроматография на QAE-сефадексе А-50	48	8,117	389,6	0,970	8,368	148,8
5. FPLC на Superose HR	3,5**	4,608	16,1	0,065	70,568	1188,0

Примечание. * - Активность определяли, используя БАЭЭ в качестве субстрата.

** - Вносимый объем раствора препарата на колонку составил 500 мкл.

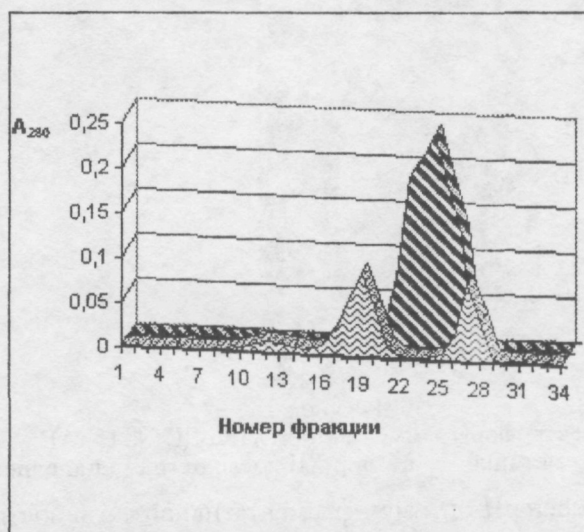


Рисунок 2

Гель-фильтрация фактора XII на Superose 6 HR с использованием хроматографии при умеренном давлении (FPLC® System).

▨ Содержание белка A₂₈₀;

▤ Активность фактора XIIa. Условия описаны в тексте.

β-XIIa, в дальнейшем были охарактеризованы как фрагмент фактора XII (β - XIIa) с удельной активностью 2,5 Ед./мг белка.

Во всех случаях за единицу (Ед.) активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата при 25°C за 1 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Физико-химические и энзиматические свойства фактора XII и его фрагмента β-XIIa.

Для характеристики, полученных нами препаратов фактора XII и его активного фрагмента β-XIIa, была определена молекулярная масса [20], исследованы электрофоретическая подвижность [21], изоэлектрическая точка [22], рН оптимума действия, рН стабильности, субстратная специфичность. Ниже

ОЧИСТКА ФАКТОРА XII И ЕГО АКТИВНОГО ФРАГМЕНТА (β -XIIa).

приведена характеристика полученных препаратов.

Фактор XII: Активность фактора XII по его прекалликреин-активирующему действию после активации фактора трипсином составляла в среднем 80 Ед./мг. По результатам проведенного диск-электрофореза полученный препарат является гомогенным белком.

Молекулярную массу фермента определяли в вертикальном плоском полиакриламидном геле (Midget Electrophoresis System Pharmacia LKB Pribori AB). Как видно из рис. 3, электрофорез в акриламидном геле выявляет одну полосу с молекулярной массой 80 кДа, что согласуется с литературными данными [23-27].

Изoeлектрическую точку фермента определяли изoeлектрофокусированием в ПААГ в градиенте pH от 3 до 10. Полученное нами значение pI равно 6,0, что практически совпадает с данными других исследователей [26, 28-30, 32].

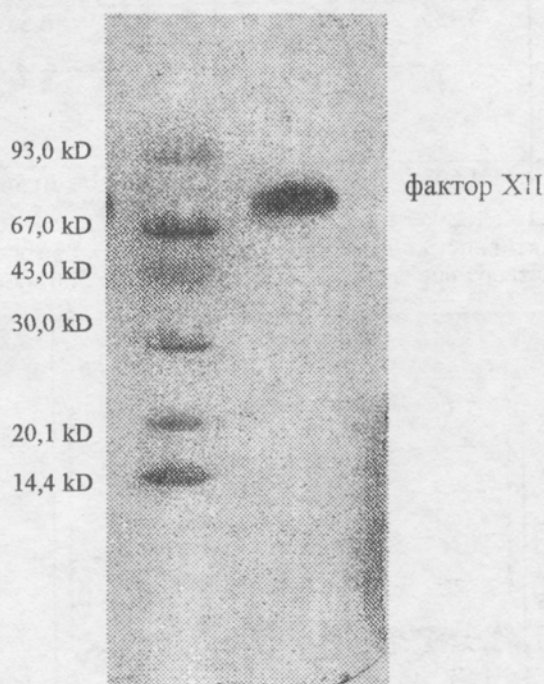


Рисунок 4

Электрофореграмма фактора XII в ДС-Na ПААГ.

1 - белки - метчики. 2 - фактор XII после пяти стадий очистки.

Также был измерен pH-оптимум ферментативной активности фактора XII по его прекалликреин-активирующему действию после активации фактора трипсином при разных значениях pH буферных систем (5,0, 6,35, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0) при температуре 37° С, который составлял 8,0.

Гидролиз хромогенных субстратов показал, что фактор XII расщепляет S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNa-2HCl) с $K_m=0,5$ mM, но не активен в отношении субстрата *Chromozym PK* (Bz-Pro-Phe-Arg-4-pNa).

Активный фрагмент β -XIIa

Прекалликреин-активирующее действие β -XIIa определяли по БАЭЭ-эстеразной активности образовавшегося К. Удельная активность полученного нами фрагмента β -XIIa составляет 1,5- 2,5 Ед. на мг белка. Не представляется возможным сравнить установленную активность с литературными данными, так как в известных работах активность β -XIIa определена другими методами [24, 28].

По результатам проведенного диск-электрофореза в 7% и 10% ПААГ фермент является гомогенным белком и электрофореграмма имеет одну белковую зону. При проведении диск-электрофореза в ПААГ β -XIIa и сыворотки крови

человека установлено, что он мигрирует в область альбумина. Эти данные полностью согласуются с результатами других исследователей [25, 27, 32] и имеет молекулярную массу 28 кДа [24, 27, 28].

pI β -XIIa была определена изоэлектрофокусированием в ПААГ в градиенте pH от 3 до 10 (также как описано для фактора XII). pI β -XIIa располагается в интервале pH от 4,5 до 4,6. Эти результаты согласуются с данными из литературных источников [25, 27].

pH-оптимум фактора β -XIIa определяли по его прекалликреин-активирующему действию при различных значениях pH буферных систем (6,35, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0) при температуре 37° С.

Таким образом, разработанный нами метод позволяет получать из одной порции сыворотки крови высокоочищенные препараты фактора XII и его активной формы (фактора β -XIIa), а также ПК, который может быть использован в качестве субстрата для идентификации и определения фактора XII и его активного фрагмента β -XIIa.

Современные способы препаративного выделения фактора XII из плазмы крови человека были впервые применены в 1960-х годах и представляют собой многоступенчатые методы с использованием ионнообменной, гелевой и аффинной хроматографии [24-26, 28, 29, 31-40]. В результате были получены гомогенные высокоочищенные препараты фактора XII с индексом очистки в несколько тысяч раз и выходом около 10%. Наиболее очищенные препараты фактора XII описаны Silverberg и Kaplan [25], при этом были получены также очищенные препараты α -XIIa и β -XIIa. Одновременно были выделены препараты ПК и фактора XI.

В отличие от описанных в литературе способов получения фактора XII предложенный нами метод получения фактора XII и его активного фрагмента β -XIIa из одной порции сыворотки крови донора прост и не уступает ранее известным, а использование хроматографии при умеренном давлении (FPLC® System) позволило повысить удельную активность и выход полученных препаратов.

Работа была поддержана грантами Департамента науки и промышленной политики, ОАО "Московский комитет по науке и технологиям" при Правительстве Москвы в 2000 г. и 2002 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Que, B.G., and Davie, E.W. (1986) *Biochemistry*, **25**, 1525.
2. Bhoola, K.D., Figueroa, C.D., and Worthy, K. (1992) *Pharmacol. Rev.*, **44**, 1-60.
3. Scott, C.F., Silver, L.D., Schapira, M., and Colman, R.W. (1984) *J. Clin. Invest.*, **73**, 954 - 962.
4. Colman, R.W. (1996) *Immunopharmacology*, **32**, 9 - 18.
5. Schmaier, A.H., Schutsky, D., Farber, A., Silver, L.D., Bradford, H.N., and Colman, R.W. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 1405 - 1411.
6. De la Cadena, R., and Colman, R. (1992) *Protein Sci.*, **1**, 151-160.
7. Fujikawa, K., and McMullen, B.A. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 10924.
8. McMullen, B.A., and Fujikawa, K. J. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 5328.
9. Fujikawa, K., Heimark, R.L., Kurachi, K., and Davie, E.W. (1980) *Biochemistry*, **19**, 1322.
10. Fujikawa, K., and Davie, E.W. (1981) *Methods Enzymol.*, **80**, 198 - 211.
11. Dunn, J.T., and Kaplan, A.P. (1982) *J. Clin. Invest.*, **70**, 627 - 631.
12. Tans, G., and Rosing, J. (1987) *Sim. Thrombosis Hemostasis*, **13**, 25 - 35.
13. Miles, L.A., Greengard, J.S., and Griffin, J.H. (1983) *Thromb. Res.*, **9**, 407-417.
14. Ghebrehiwet, B., Silverberg, M., and Kaplan, A.P. (1981) *J. Exp. Med.*, **153**, 665-676.
15. Colman R. W., Schmaier A.H. (1977) *Blood*, **90**, 3819-3843.
16. Colman R.W., Pixley R.A., Najamunnisa S., Yan W.-Y., Wang J., Mazar A.,

ОЧИСТКА ФАКТОРА XII И ЕГО АКТИВНОГО ФРАГМЕНТА (β -XIIa).

- McCrae K.R. (1977) J. Clin. invest. **100**, 1481-1487.
17. Rojkaer R., Schmaier A.H. (1999) Proc. Assoc. Am. Phys., **111**, 220-227.
18. Rojkaer R., Schmaier A.H. (1999) Immunopharmacology, **43**, 109-114.
19. Joser K., Shibayama Y., Nakazawa Y., Peerschke E.I.B., Ghebrehewet B., Kaplan A.P. (1999) Immunopharmacology, **43**, 203-210.
20. Laemmli U.K. (1970) Nature, **227**, 680-685.
21. Мауер Г. (1971) Диск-электрофорез, Мир, Москва.
22. Williams K.W., Soderberg L. (1979) International Laboratory, №1, 245-279.
23. Movat H.Z. (1979) Handbook of Experimental pharmacology. Ed. Erdos E.G.-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 255, 2-89.
24. Fujikawa K., Davie E.W. (1981) Methods Enzymol., **80**, 198 - 211.
25. Silverberg M., Kaplan A.P. (1988) Methods Enzymology, 163M, 68-78.
26. Griffin J.H., Cochrane C.G. (1976) Enzymology, Ed. Lorand L., Academic Press, 45B, 56-63.
27. Крижевская Ю.В., Яровая Г.А., Доценко В.Л. (1981) Биохимия, **46**, 1510-1517.
28. Kaplan A.P., Austen K.F. (1971) J. Exp. Med., **133**, 696-712.
29. Weiss A., Galiin J., Kaplan A. (1974) J. Clin. Invest, **53**, 622-633.
30. Dotsenko V.L., Nenasheva N.M., Neshkova E.A., Yarovaya G.A. (1989) Advances in Experimental Medicine and Biology, Kinin V Ed. Abe K., Moriya H., Fumii S., New York: Plenum Press, B, 515-521.
31. Silverberg M., Kaplan A.P. (1988) Methods in enzymology, 163M, 68- 78.
32. Kaplan A.P., Meyer M.L., Mandle R.J. (1977) Mediators of the Immediate Type Inflammatory Reaction /Monographs in Allergy/, 120-131.
33. Schiffman S., Rapaport S.T., Uare A.G. (1960) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **105**, 453-465.
34. Ratnoff O.D., Davie E.W. (1961) J. Clin. Invest., **41**, 803-824.
35. Ratnoff O.D., Davie E.W. (1962) Biochemistry, **1**, 967-978.
36. Speer R.J., Ridgway H., Hill J.M. (1965) Thromb. Diath. Haemor., **14**, 1-14.
37. Cochrane C.G., Wuepper K. (1971) J.Exp.Med., **134**, 986-1004.
38. Bagdasarian A., Talamo R.C., Colman R.W. (1973) J. Biol. Chem., **248**, 3456-3463.
39. Revak S.D., Cochrane C.G., Johnston A.R., Johnston A.R. (1974) J.Clin. Invest, **54**, 619-627.
40. Movat H.Z., Ozge-Anwar A.H. (1974) J. Lab. Clin. Med., **84**, 861-878.

Поступила 27.06.2002.

ISOLATION, PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE BLOOD COAGULATION FACTOR XII AND ACTIVE FRAGMENT (β -XIIa).

T.B. Blokhina, E.A. Neshkova, G.A. Yarovaya

Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Barrikadnaya st., 2; Moscow, 123995 Russia; fax (095)945-24-15; e-mail: acadbio@orc.ru.

A procedure of isolation of human blood plasma prekallikrein, coagulation factor XII and active fragment β -XIIa has been developed. This procedure includes the traditional chromatography steps and FPLC. Disc-electrophoresis revealed that the preparations of factor XII and β -XIIa were homogeneous. Their specific activity was 70,6 U and 2,5 U, respectively. The procedure described is less time consuming and it allows to isolate these factors in the preparative quantities.

Key words: contact system activation, coagulation factor XII, fragment β -XIIa, isolation, purification, properties.